

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日:

2003年12月24日(24.12.2003)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 03/106481 A1

518940

18/518940

(51) 国际分类号: C07K 5/062

(21) 国际申请号: PCT/CN03/00417

(22) 国际申请日: 2003年5月30日(30.05.2003)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
02123369.1 2002年6月17日(17.06.2002) CN(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 厦门大学
(XIAMEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国福建省
厦门市思明南路422号, Fujian 361005 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 赵玉芬(ZHAO, Yufen)
[CN/CN]; 唐果(TANG, Guo) [CN/CN]; 周宁(ZHOU,
Ning) [CN/CN]; 胡利明(HU, Liming) [CN/CN]; 陈勇
(CHEN, Yong) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明南路
422号厦门大学化学系, Fujian 361005 (CN)。(74) 代理人: 中原信达知识产权代理有限责任公司
(CHINA SINDA INTELLECTUAL PROPERTYLTD.); 中国北京市西城区金融街19号富凯大厦B座
11层, Beijing 100032 (CN)。(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)本国际公布:
— 包括国际检索报告。所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A PROCESS OF PRODUCING ALA-GLU DIPEPTIDE

(54) 发明名称: 丙-谷二肽合成方法

(57) Abstract: The present invention relates to a process of producing Ala-Glu dipeptide, comprising of: the amino acid protected at N-end reacts with triphenyl phosphine and hexachloroethane in an organic solvent, forming an active ester; the active ester reacts with glutamine in an organic solvent and an aqueous inorganic base solution, acidizing the result reaction mixture with an inorganic acid, deprotected the protection group at N-end. The raw materials are inexpensive. The synthesis process is not difficult. It not necessary to separate the intermediate, or to purify it. It is easy to separate and purify the product. The reagents used in the process are less toxicity so that it is suit for environment.

(57) 摘要

涉及一种丙-谷二肽合成方法, 其包括如下步骤: N 端保护的氨基酸与三苯基膦、六氯乙烷在有机溶剂中反应形成活泼酯; 该活泼酯与谷氨酰胺在有机溶剂和无机碱水溶液的混合溶液中进行反应, 所得反应混合物用无机酸酸化, 然后脱去 N 端保护基团。其原料便宜, 合成工艺简单, 中间产物不需要分离和提纯处理, 产物容易分离提纯, 整个合成过程中所采用的试剂毒性均较小, 有利于环保。

丙-谷二肽合成方法

5

本发明涉及一种含氨基酸的二肽合成方法，尤其是一种丙-谷二肽合成方法。

谷氨酰胺是人体中含量最多的氨基酸，谷氨酰胺在肌肉蛋白质和血浆蛋白质中含量约分别为 75%和 26%。

谷氨酰胺具有重要的生理作用。谷氨酰胺是生物合成核酸的必需前体物质，是蛋白质
10 合成与分解的调节物，是氨基氮从外周组织转动至内脏的携带者，是肾脏排泄氮的重要基
质。谷氨酰胺是肠粘膜上皮细胞、肾小管细胞、巨噬细胞和成纤维细胞的重要能量物质，
在维持肠道机能，促进免疫功能，维持体内碱平衡及提高机体对应激的适应等方面都发挥
着极其重要的作用。

在临床上的严重感染、复合性骨折、创伤、大手术、大面积烧伤与恶性肿瘤后期等应
15 急和高分解代谢状态下，谷氨酰胺的需要大大超过了机体合成谷氨酰胺的能力，使体内谷
氨酰胺的含量降低，从而使核酸、蛋白质合成减少。若采用传统的全静脉营养液（TPN），
则可能导致肠粘膜萎缩，肠粘膜通透性升高和细菌易位，甚至导致败血症及多器官功能衰
竭。大量的实验表明，补充 GLN 的 TPN 对许多疾病的预防和恢复有显著作用，若在 TPN
中加入一定量的谷氨酰胺，以提高血液和肌肉等组织中谷氨酰胺浓度，则对维持或恢复肠
20 粘膜功能具有重要作用。给严重感染的病人输入补充 GLN 的 TPN，明显保持正氮平衡和
促进细胞 GLN 合成酶的表达，减轻肌细胞内 GLN 浓度和核糖体浓度的降低。

近年来，因为谷氨酰胺重要的生理功能和药理作用，使其在肠外营养中的应用受到人
们普遍的重视。如上所述，在各种创伤（包括意外伤、手术伤、及辐射伤）、感染等应激
条件下，血中和细胞中的谷氨酰胺浓度降低，而补给现有的氨基酸制剂（不含 GLN），不
25 能使其逆转；一些重要的细胞功能如蛋白质的合成、细胞的吞噬作用和淋巴细胞的增殖，
都必须依赖充足的 GLN。但是由于它的溶解度低，而且溶液中不稳定，在加热灭菌的条
件下，生成有毒的焦谷氨酸和氨，所以商品氨基酸制剂中都不含有 GLN。目前 GLN 的应
用主要有以下途径：（1）现配现用，把 GLN 晶体加到氨基酸溶液中，然后过滤除菌，在
8 小时内输完。这一过程必须严格无菌操作且工作繁琐，费力，适用范围受到限制；（2）
30 合成 GLN 衍生物，如乙酰谷酰胺。它容易合成，加热稳定，在体内可形成 GLN，便是它
的利用率较低，摄入量的 40%被从尿中排泄掉；（3）应用 GLN 的二肽。

目前，用于试验研究的二肽主要有两种：甘氨酰谷氨酰胺（L-glynyl-L-glutamine, L-

Gly-L-Gln) 和丙氨酰谷氨酰胺(丙-谷二肽,L-alanyl-L-glutamine, L-Ala-L-Gln)。动物和人体实验证明, 在体内, 这两种二肽很快被降解为其组成氨基酸, 半衰期很短, 血液中只能检测到少量的二肽, 仅有微量的二肽从尿中排出。说明 Gln 二肽可有效地利用而且不会在血液中积聚, 避免了二肽可能产生的药理及生理性损害。实验证明, 健康人体长期静脉滴注 L-Ala-L-Gln 二肽没有任何副作用及不良反应, 不影响正常的肾功能。用化学方法合成的 L-Ala-L-Gln 经纯化其溶解度是 Gln 单体的 20 倍, 在储存和加热灭菌时也很稳定, 而进入体内后即迅速分解成 Gln 而发挥作用, 使 Gln 在 TPN 中的应用方便可行。

丙-谷二肽合成方法有如下 4 种:

1、首先将 Gln (谷氨酰胺) 的末端氨基进行保护, 例如形成苄氧羰基保护的谷氨酰胺(Cbz-Gln); 第二步, 将 Cbz-Gln 的酰氨基保护形成 Cbz-Gln (OC₁₃H₉); 第三步, 将 Cbz-Gln (OC₁₃H₉) 的羧基中的羟基保护形成 Cbz-Gln (OC₁₃H₉) OMe; 第四步, 通氢气形成 Gln (OC₁₃H₉) OMe; 第五步, 加入 Cbz-Ala; 第六步, 对 Cbz-Ala 活化; 第七步, Cbz-Ala 和 Gln (OC₁₃H₉) OMe 结合成肽; 第八步, 皂化脱甲酯; 第九步, 酸化脱去全部保护, 形成丙-谷二肽。(文献 Yasutsugu Shimomishi, Studies on the Synthesis of Peptides Containing Glutamine as the C-Terminal. Y. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1962, 35, 1966) 该方法反应步骤太多, 而且试剂昂贵, 无实际应用价值。

2、利用苄氧羰基保护的丙氨酸(Z-Ala)与 HOSu 在二环己基碳二亚胺(DCC)作用下, 于 20~25℃反应 5 小时, 过滤去二环己基脲, 然后与未保护的 Gln 于碳酸氢钠的水溶液中进行合成。产物在甲醇中还原氢化, 脱去保护基, 即可得到丙-谷二肽。(文献 Katoh, T. Kurauchi, M. Eur. Pat 311,057, 12 Apr. 1989) 该方法的试剂昂贵, 而且 DCC 反应后的产物难以除去, 生产过程复杂。

3、利用光气(COCl₂)与 Ala 反应生成混酐, 然后与 Gln 在水中反应, pH 保持在 10.2。最后在酸溶液中脱去保护, 即可得到丙-谷二肽。(文献 Frerst, P. Pfaendetr, P. Ger. Offen. DE 3206,784.01 Sep 1983) 此方法的反应步骤少, 但光气为剧毒气体, 而且该反应难以反应完全, 对人体危害较大。

4、利用手性试剂氯代丙酸通过 SOCl₂ 活化, 形成酰氯, 然后与 Gln 在 NaOH 的水溶液中反应, pH 保持在 10。产物为氯代丙酰谷氨酰胺, 再与液氨在一定的压力下反应, 即可得到丙-谷二肽。(文献 Takahiro Sano, Toru Sugaya, Process Research and Development of l-Alanyl-l-glutamine, a Component of Parenteral Nutrition. Organic Process Research and Development. 2000, 4, 147-152) 该反应的原料为手性试剂, 价格较高, 在合成酰氯步骤中,

温度较高，副反应较多。该合成用于生产，成本太高。

本发明的目的在于提供一种原料便宜、合成工艺简单、设备简单、成本低、产率高、有利于环保的丙-谷二肽合成方法。

丙-谷二肽合成方法的步骤：

5 1) N端保护的丙氨酸(I) 10mmol, 与三苯基磷(Ph_3P) 10~30 mmol, 最佳 15~20 mmol, 六氯乙烷(C_2Cl_6) 10~30 mmol, 最佳 15~20 mmol, 在有机溶剂(II)中反应 0.3~3 小时, 最佳 1.5~2 小时, 反应温度-5~30℃, 最佳 0~10℃, 形成活泼酯;

2) 将步骤 1) 所得的含所述活泼酯的反应混合物与谷氨酰胺 10~30 mmol, 最佳为 15~20 mmol, 在有机溶剂(III)和无机碱水溶液(IV)的混合液中进行反应, 其中 III 和 IV 10 的体积比值为 0~4 (由于在步骤 1) 中已有有机溶剂存在, 当采用的有机溶剂(III)与步骤 1) 中所采用的有机溶剂(II)相同或具有类似的性质时, 在步骤 2) 中可不再使用有机溶剂, 此时, III 和 IV 的体积比值则为 0), 最佳为 0.5~2, 反应温度为-5~30℃, 最佳为 5~10℃, pH 控制在 8.5~13, 最佳为 9.5~10.5; 最优选步骤 2) 是在搅拌条件下完成的, 即, 将步骤 1) 获得的活泼酯与谷氨酰胺 10~30 mmol 在搅拌着的有机溶剂(III)和无机 15 碱水溶液(IV)的混合液中进行反应, 在反应过程中维持搅拌并维持 pH 为 9.5-10.5。

3) 用无机酸(V)酸化至 $\text{pH} \leq 3.0$, 最佳为 2.0~3.0, 和

4) 用脱保护试剂(VI)脱去 N 端保护基团, 得到丙-谷二肽, 产率为 30~65%。

其中(I), N端保护的氨基酸主要有: N-(O,O-二甲基)磷酰丙氨酸(DMP-L-Ala), N-(O,O-二乙基)磷酰丙氨酸(DEP-L-Ala), N-(O,O-二异丙基)磷酰丙氨酸(DIPP-L-Ala), N-(O,O-二正丁基)磷酰丙氨酸(DBP-L-Ala), 苄氧羰基丙氨酸(Z-L-Ala), (对 20 甲氧羰基)苄氧羰基丙氨酸(MZ-L-Ala), 叔丁氧羰基丙氨酸(Boc-L-Ala), 2-(二联苯基)异丙氧羰基丙氨酸(Bpoc-L-Ala), 等;

(II) 有机溶剂主要有: 二氯甲烷, 甲苯, 四氢呋喃, 乙腈, 1, 2-二氯乙烷, 等;

(III) 有机溶剂主要有: 乙醇, 乙酸乙酯, 石油醚, 环己烷, 甲苯, 二氯甲烷, 等;

25 (IV) 无机碱主要有: 氢氧化钠, 氢氧化钾, 碳酸氢钠, 碳酸氢钾, 碳酸钠, 碳酸钾, 等;

(V) 无机酸主要有: 盐酸, 硫酸, 硝酸, 磷酸, 等;

(VI) 脱保护基所用试剂主要有: 三氟乙酸, 氯化氢/冰乙酸, 溴化氢/冰乙酸, 甲基磺酸, 氢化还原, 氯化氢/1, 4-二氧六环, 溴化氢/1, 4-二氧六环, 等。

30 与已有的丙-谷二肽合成方法相比, 本发明的主要优点是:

1) 原料极为便宜;

2) 合成工艺简单, 中间产物不需要分离, 直接进行下一步反应, 反应结束后, 产物容易分离提纯;

3) 活性酯在酸性介质中形成, 避免了有机碱引起的产物消旋化;

5 4) 在第二步反应, 采用了水相法, 省去了谷氨酰胺氨基酸接保护基团保护和脱除保护基团, 简化了合成路线, 缩短了时间。

5) 由于第二步采用了水相法, 用无机碱代替了有机碱, 降低了生产成本, 有利于环保;

6) 反应结束后, 生成两个产物, 其一为所需的丙-谷二肽, 另一个为副产物(三苯基氧磷), 三苯基氧磷为不挥发的固体, 容易回收, 还可还原为反应原料重新投入反应;

7) 整个合成过程中所采用的溶剂均易于回收再利用。

总之, 本方法合成路线短, 原料便宜易得, 有利于环保, 生产工艺合理, 成本低, 有着良好的应用价值。

以下结合实施例对本发明作进一步的说明。

15 实施例 1

六氯乙烷 20mmol 用 10mL 二氯甲烷溶解, 滴加到 N-(O,O-二甲基)磷酰丙氨酸 10mmol、三苯基磷 20mmol 和 20mL 甲苯的混合体系内, 于 0℃反应 3 小时后, 将反应混合物滴加到搅拌着的含有 25mmol 谷氨酰胺, 20mL 水, 60mL 石油醚中, 并用氢氧化钾 20mmol 和碳酸钾调 pH 至 10, 反应温度为 0℃, 滴加后反应 1.5 小时, 在反应过程中维持 20 搅拌并维持 pH 为 10。然后用浓盐酸酸化至 pH 为 2.5, 水相浓缩后用甲磺酸室温反应 20 小时, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用异丙醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 65%。[α]_{20D} = 10.55, C=2, m.p. 214-215.5℃

实施例 2

六氯乙烷 20mmol 用 10mL 二氯甲烷溶解, 滴加到 10mmol N-(O,O-二甲基)磷酰丙氨酸、20mmol 三苯基磷和 20mL 甲苯的混合体系内, 于 0℃反应 3 小时后, 滴加到含有 25mmol 谷氨酰胺、20mL 水和 60mL 石油醚的混合液中, 反应中用氢氧化钾 20mmol, 然后用碳酸钾调 pH 为 10, 反应温度为 0℃, 滴加后反应 1.5 小时。然后用浓盐酸酸化至 pH 为 2.5, 水相浓缩后用甲磺酸室温反应 20 小时, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用异丙醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 45%。

30 实施例 3

三苯基酸 30mmol 用 30mL 四氢呋喃溶解，滴加到 N-(O,O-二甲基)磷酰丙氨酸 10mmol，和六氯乙烷 30mmol,10mL 四氢呋喃的混合体系内，于 10℃反应 20 分钟后，滴加到含有 30mmol 谷氨酰胺，水 20mL，环己烷 20mL 的混合液中，反应中用氢氧化钠调 pH 为 12，反应温度为 25℃，滴加后反应 30 分钟。然后用稀硝酸酸化至 pH 为 1.5，水相浓缩后用 20%溴化氢/冰乙酸室温反应 5 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用甲醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 50%。

实施例 4

N-(O,O-二甲基)磷酰丙氨酸 10mmol，三苯基磷 20mmol 和六氯乙烷 30mmol 分别加入圆底烧瓶，再加入 20mL 甲苯，于 5℃反应 1 小时后，滴加到含有 10mmol 谷氨酰胺，20mL 水，5mL 乙醇的混合液中，反应中用碳酸钠调 pH 为 9.5，反应温度为 5℃，滴加后反应 10 分钟。然后用磷酸酸化至 pH 为 1.0，水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 15 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用乙醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 40%。

实施例 5

三苯基磷 20mmol 用 10mL 甲氢呋喃溶解，滴加到 N-(O,O-二乙基)磷酰丙氨酸 10mmol、30mmol 六氯乙烷和 10mL 四氢呋喃的混合体系内，于-5℃反应 2 小时后，滴加到含有 10mmol 谷氨酰胺，20mL 水，20mL 乙醇的混合液中，反应中用氢氧化钠 10mmol，然后用碳酸氢钠调 pH 为 9.5，反应温度为-5℃，滴加后反应 2 小时。然后用浓盐酸酸化至 pH 为 3，水相浓缩后用饱和氯化氢/冰乙酸室温反应 5 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用乙醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 35%。

实施例 6

六氯乙烷 30mmol 用 20mL 二氯甲烷溶解，滴加到 10mmol N-(O,O-二乙基)磷酰丙氨酸、30mmol 三苯基磷和 10mL 二氯甲烷的混合体系内，于 0℃反应 40 分钟后，滴加到含有 30mmol 谷氨酰胺，20mL 水，10mL 环己烷的混合液中，反应中用氢氧化钾调 pH 为 13，反应温度为 20℃，滴加后反应 30 分钟。然后用稀硝酸酸化至 pH 为 1.5，水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 10 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用 1,4-二氧六环-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 60%。

实施例 7

10mmol N-(O,O-二乙基)磷酰丙氨酸，10mmol 三苯基磷和 15mmol 六氯乙烷分别加入圆底烧瓶，再加入 20mL 乙腈，于 15℃反应 2.5 小时后，滴加到含有 30mmol 谷氨

酰胺, 20mL 水, 30mL 甲苯的混合液中, 反应中用碳酸钠调 pH 为 8.5, 反应温度为 30℃, 滴加后反应 1 小时。然后用稀硫酸酸化至 pH 为 2, 水相浓缩后用饱和溴化氢/1,4-二氧六环室温反应 5 小时, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用四氢呋喃-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 50%。

5 实施例 8

N-(O,O-二异丙基)磷酰丙氨酸, 三苯基膦和六氯乙烷各 10 mmol 分别加入圆底烧瓶, 再加入 20mL 四氢呋喃, 于 30℃ 反应 2 小时后, 滴加到含有 15 mmol 谷氨酰胺, 20mL 水, 10mL 乙醇的混合液中, 反应中用氢氧化钠调 pH 为 10.5, 反应温度为 -5℃, 滴加后反应 2 小时。然后用浓盐酸酸化至 pH 为 3.0, 水相浓缩后用饱和氯化氢/冰乙酸室温反应 5 小时, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用乙醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 60%。

实施例 9

三苯基膦 15mmol 用 20mL 二氯甲烷溶解, 滴加到含 10mmol N-(O,O-二异丙基)磷酰丙氨酸、20mmol 六氯乙烷的 10mL 二氯甲烷的混合体系内, 于 10℃ 反应 3 小时后, 滴加到含有 10mmol 谷氨酰胺, 20mL 水, 20mL 乙酸乙酯的混合液中, 反应中用氢氧化钠 10mmol, 然后用碳酸氢钠调 pH 为 9.0, 反应温度为 10℃, 滴加后反应 1 小时。然后用稀硫酸酸化至 pH 为 2.0, 水相浓缩后用 20% 溴化氢/冰乙酸室温反应 5 小时, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用甲醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 30%。

实施例 10

六氯乙烷 15mmol 用 10mL 1,2-二氯乙烷溶解, 滴加到含 10mmol N-(O,O-二异丙基)磷酰丙氨酸、15mmol 三苯基膦和 10mL 1,2-二氯乙烷的混合体系内, 于 20℃ 反应。1.5 小时后, 滴加到含有 20mmol 谷氨酰胺的 20mL 水中, 反应中用氢氧化钾调 pH 为 13, 反应温度为 10℃, 滴加后反应 2 小时。然后用稀硝酸酸化至 pH 为 1.5, 水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 10 小时, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用异丙醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 52%。

实施例 11

叔丁氧羰基丙氨酸 (Boc-Ala) 10mmol, 三苯基膦 15mmol 和六氯乙烷 20mmol 分别加入圆底烧瓶, 再加入 20mL 1,2-二氯乙烷, 于 10℃ 反应 20 分钟后, 滴加到含有 30mmol 谷氨酰胺, 20mL 水, 20mL 环己烷的混合液中, 反应中用氢氧化钾调 pH 为 11, 反应温度为 20℃, 滴加后反应 30 分钟。然后用稀硝酸酸化至 pH 为 1.5, 水相浓缩后用三氟乙酸

室温反应 15 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用四氢呋喃一水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 40%。

实施例 12

三苯基膦 10mmol 用 10mL 甲苯溶解，滴加到 10mmol 叔丁氧羰基丙氨酸 (Boc-Ala)，
5 10mmol 六氯乙烷，和 20mL 甲苯的混合体系内，于 5℃ 反应 2 小时后，滴加到含有 15mmol 谷氨酰胺，20mL 水，60mL 石油醚的混合液中，反应中用氢氧化钠调 pH 为 12，反应温度为 10℃，滴加后反应 1.5 小时。然后用稀硫酸酸化至 pH 为 1.5，水相浓缩后用氯化氢/1,4-二氧六环室温反应 5 小时。反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用 1,4-二氧六环一水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 52%。

10 实施例 13

六氯乙烷 20mmol 用 10mL 四氢呋喃溶解，滴加到含 10mmol 叔丁氧基丙氨酸 (Boc-Ala)，20mmol 三苯基膦，和 10mL 四氢呋喃的混合体系内，于 0℃ 反应 1.5 小时后，滴加到含有 20mmol 谷氨酰胺、20mL 水和 15mL 二氯甲烷的混合液中，反应中用氢氧化钾
15 20mmol，然后用碳酸钠调 pH 为 10，反应温度为 8℃，滴加后反应 2 小时，然后用浓盐酸酸化至 pH 为 2.0，水相浓缩后与甲磺酸室温反应 20 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用甲醇一水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 45%。

实施例 14

苄氧羰基丙氨酸 (Z-Ala) 10mmol，三苯基膦 10mmol 和六氯乙烷 10mmol 分别加入圆底烧瓶，再加入 30mL 甲苯，于 0℃ 反应 3 小时后，滴加到含有 25mmol 谷氨酰胺的 20mL
20 水中，反应中用氢氧化钠调 pH 为 12，反应温度为 15℃，滴加后反应 1.5 小时。然后用稀盐酸酸化至 pH 为 2.5，水相浓缩后用氢气在甲醇中室温反应 15 小时，得产物 L-Ala-L-Gln。产率 48%。

实施例 15

三苯基膦 15mmol 用 10mL 四氢呋喃溶解，滴加到 10mmol 苄氧羰基丙氨酸 (Z-Ala)、
25 20mmol 六氯乙烷 和 10mL 四氢呋喃的混合体系内，于 0℃ 反应 1.5 小时后，滴加到含有 18mmol 谷氨酰胺，20mL 水，40mL 二氯甲烷的混合液中，反应中用氢氧化钾调 pH 为 13，反应温度为 0℃，滴加后反应 2 小时。然后用稀硫酸酸化至 pH 为 2.0，水相浓缩后用氢气在甲醇中室温反应 15 小时，得产物 L-Ala-L-Gln。产率 65%。

实施例 16

30 六氯乙烷 30mmol 用 10mL 乙腈溶解，滴加到苄氧羰基丙氨酸 (Z-Ala) 10mmol，20mmol

三苯基膦和 10mL 乙腈的混合体系内，于 5℃ 反应 1.0 小时后，滴加到含有 10mmol 谷氨酰胺的 20mL 水中，反应中用氢氧化钠 20mmol，然后用碳酸氢钾调 pH 为 10，反应温度为 5℃，滴加后反应 2 小时。然后用浓盐酸酸化至 pH 为 3.0，水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 40 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用 1,4-二氧六环-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 45%。

10

15

20

权 利 要 求 书

1. 丙-谷二肽合成方法, 其特征在于:

- 5 1) N 端保护的丙氨酸 10mmol 与三苯基磷 10~30 mmol 和六氯乙烷 10~30 mmol, 在有机溶剂中反应 20 分钟~3 小时, 反应温度为-5~30℃, 形成活泼酯;
- 2) 将步骤 1)获得的活泼酯与谷氨酰胺 10~30 mmol 在有机溶剂和无机碱水溶液的混合液中进行反应, 生成 N 端保护的丙-谷二肽, 其中有机溶剂和无机碱水溶液的体积比值为 0~4, 反应温度为-5~30℃, pH 控制在 8.5~13;
- 10 3) 用无机酸将步骤 2)的反应混合物酸化至 $\text{pH} \leq 3.0$, 和
- 4) 用脱保护试剂脱去 N 端保护基团, 得到丙-谷二肽。

2. 如权利要求 1 所述的丙-谷二肽合成方法, 其特征在于:

- 1) N 端保护的丙氨酸 10mmol 与三苯基磷 15~20 mmol 和六氯乙烷 15~20 mmol, 在有机溶剂中反应 1.5~2 小时, 反应温度 0~10℃, 形成活泼酯;
- 15 2) 将步骤 1)获得的活泼酯与谷氨酰胺 15~20 mmol 在有机溶剂和无机碱水溶液的混合液中进行反应, 生成 N 端保护的丙-谷二肽, 其中有机溶剂和无机碱水溶液的体积比值为 0.5~2, 反应温度为 5~10℃, pH 控制在 9.5~10.5;
- 3) 用无机酸将步骤 2)的反应混合物酸化至 pH 为 2.0~3.0。

20 3. 如权利要求 1 或 2 所述的丙-谷二肽合成方法, 其特征在于 N 端保护的丙氨酸是: N-(O,O-二甲基)磷酰丙氨酸 (DMP-L-Ala), N-(O,O-二乙基)磷酰丙氨酸 (DEP-L-Ala), N-(O,O-二异丙基)磷酰丙氨酸 (DIPP-L-Ala), N-(O,O-二正丁基)磷酰丙氨酸 (DBP-L-Ala), 苄氧羰基丙氨酸 (Z-L-Ala), (对甲氧羰基)苄氧羰基丙氨酸 (MZ-L-Ala), 叔丁氧羰基丙氨酸 (Boc-L-Ala), 或 2-(二联苯基)异丙氧羰基丙氨酸 (Bpoc-L-Ala)。

25 4. 如权利要求 1 或 2 所述的丙-谷二肽合成方法, 其特征在于步骤 1)中的有机溶剂选自: 二氯甲烷, 甲苯, 四氢呋喃, 乙腈和 1,2-二氯乙烷。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的丙-谷二肽合成方法, 其特征在于步骤 2)中的有机溶剂
30 选自: 乙醇, 乙酸乙酯, 石油醚, 环己烷, 甲苯和二氯甲烷。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的丙-谷二肽合成方法, 其特征在于步骤 2)中的无机碱选

自：氢氧化钠，氢氧化钾，碳酸氢钠，碳酸氢钾，碳酸钠和碳酸钾。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的丙-谷二肽合成方法，其特征在于步骤 3 中的无机酸选自：盐酸，硫酸，硝酸和磷酸。

5

8. 如权利要求 1 或 2 所述的丙-谷二肽合成方法，其特征在于脱保护试剂选自：三氟乙酸，氯化氢/冰乙酸，溴化氢/冰乙酸，甲基磺酸，氢化还原，氯化氢/1,4-二氧六环和溴化氢/1,4-二氧六环。

10 9. 如权利要求 1 或 2 所述的丙-谷二肽合成方法，其特征在于在步骤 2) 是如下完成的：将步骤 1) 获得的活泼酯与谷氨酰胺在搅拌着的有机溶剂和无机碱水溶液的混合液中进行反应，在反应过程中维持搅拌并维持 pH 为 9.5-10.5。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/00417

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C07K5/062

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SK70898 A3 WPI/DERWENT ABSTRACT (ICNC)ICN CZECH REPUBLIC AS 13.Mar. 2000 (13.03.00)	1-9
A	US4898930 6.Feb.1990 (06.02.90) see the whole document Spofa,spojene podniky pro	1-9
A	US5032675 16.Jul.1991 (16.07.91) see the whole document Ajinomoto Co.,Inc.	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
28.Aug.2003 (28.08.03)

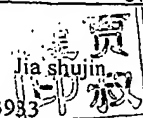
Date of mailing of the international search report

18 SEP 2003 (18.09.03)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

Telephone No. 86-10-62093933



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN03/00417

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
SK70898 A3	2000-03-13	CZ9800997	1999-10-13
US4898930	1990-02-06	EP0249434	1987-12-16
		JP63003000	1988-01-07
		JP8002916B	1996-01-17
		JP2089563C	1996-09-02
		CS8604332	1992-08-12
		CA1308515	1992-10-06
		CS277405	1993-03-17
		AT105300T	1994-05-15
		DE3789729D	1994-06-09
		DE3789729T	1994-08-18
US5032675	1991-07-16	EP0311057	1989-04-12
		JP1096194	1989-04-14
		JP8032717B	1996-03-29
		JP2104502C	1996-11-06
		DE3887246D	1994-03-03
		DE3887246T	1994-07-28

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN03/00417

A. 主题的分类

IPC7 C07K5/062

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	SK70898 A3 WPI/DERWENT 文摘 (ICNC)ICN CZECH REPUBLIC AS 2000 年 3 月 13 日(13.03.00)	1-9
A	US4898930 1990 年 2 月 6 日(06.02.90) 全文 Spofa,spojene podniky pro	1-9
A	US5032675 1991 年 7 月 16 日(16.07.91) 全文 Ajinomoto Co.,Inc.	1-9

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

2003 年 8 月 28 日(28.08.03)

国际检索报告邮寄日期

18. 9月 2003 (18.09.03)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员

电话号码: 86-10-62093933



国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/00417

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
SK70898 A3	2000-03-13	CZ9800997	1999-10-13
US4898930	1990-02-06	EP0249434	1987-12-16
		JP63003000	1988-01-07
		JP8002916B	1996-01-17
		JP2089563C	1996-09-02
		CS8604332	1992-08-12
		CA1308515	1992-10-06
		CS277405	1993-03-17
		AT105300T	1994-05-15
		DE3789729D	1994-06-09
		DE3789729T	1994-08-18
US5032675	1991-07-16	EP0311057	1989-04-12
		JP1096194	1989-04-14
		JP8032717B	1996-03-29
		JP2104502C	1996-11-06
		DE3887246D	1994-03-03
		DE3887246T	1994-07-28